

ева // Фармацевтическая отрасль. – 2015. – № 5 (52). – С. 67–75.

8. Способ модификации процесса формирования кристаллов лекарственного вещества: пат. RU 2388757 / ВИКХУЗЕН Дирк (DE), ПФЕФФЕР Забине (DE). – опубл. 10.05.2010.

9. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд., Т. II. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. – Дата доступа: 14.01.2019.

10. CH Q8. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Require-

ments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 2005. – 28 p.

Адрес для корреспонденции:

121019, Российская Федерация,
г. Москва, Никитский б-р, 13,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
Институт фармации,
кафедра фармацевтической технологии,
тел.: 89260122191,
e-mail: aganusya1@yandex.ru,
Козлова Ж. М.

Поступила 12.02.2019 г.

**И. И. Краснюк¹, В. В. Тарасов¹, Ж. М. Козлова¹, О. И. Степанова¹,
И. И. Краснюк (мл), В. В. Кугач²**

**ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ТРИТИКАИНА-α**

**¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет), г. Москва, Российская Федерация**

**²Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь**

Настоящая работа посвящена изучению физико-химических и технологических свойств тритикаина-α с целью дальнейшей разработки лекарственного препарата в виде твердых капсул для лечения целиакии. В качестве объекта исследования применяли лиофилизированный порошок рекомбинантного белка тритикаина-α в сочетании с маннитолом и поливинилпирролидоном (ПВП). Исследование проводили в соответствии с требованиями общих фармакопейных статей Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ XIV). Тритикаин-α растворим в воде очищенной, растворимость в спирте снижается при увеличении концентрации спирта. Определение сыпучести, угла естественного откоса, насыпной плотности, пористости, расчет индексов Каррра и Хауснера продемонстрировали хорошую степень сыпучести исследуемой фармацевтической субстанции. В связи с волокнистым характером структуры белка при разработке лекарственной формы потребуются введение вспомогательных веществ для повышения степени сыпучести до очень хорошей или превосходной.

Ключевые слова: тритикаин-α, рекомбинантный белок, целиакия, физико-химические и технологические свойства, разработка капсул, оценка качества.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время эпидемиологические данные указывают на значительную распространенность целиакии (болезнь Ги – Гертера – Гейбнера, или инфантилизм кишечный). Целиакия – хроническая генетически детерминированная аутоиммунная Т-клеточно опос-

редованная энтеропатия, которая характеризуется стойкой непереносимостью специфических белков эндосперма зерна некоторых злаковых культур с развитием гиперрегенераторной атрофии слизистой оболочки тонкой кишки и связанного с ней синдрома мальабсорбции. Целиакия встречается с частотой 1: 300 – 1: 3700. Женщины болеют почти

в два раза чаще мужчин. Доказанной эффективной терапией целиакии является пожизненная строгая безглютеновая диета, позволяющая предотвратить развитие осложнений и исключить клинические симптомы заболевания. Одновременно с назначением безглютеновой диеты проводят симптоматическую терапию, которая включает витамины, препараты кальция, железа, ферментные препараты, пробиотики, массаж, гимнастику и др. [1, 2].

Тритикаины (triticain- α , - β , - γ) – высококонсервативные папаин-подобные цистеиновые эндопротеазы пшеницы. Тритикаин- α способен эффективно расщеплять глютенные белки на пептиды, легко усваиваемые организмом человека. Доклинические исследования, проведенные ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И. М. Сеченова МЗ РФ» (Сеченовский Университет) в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (Государственный контракт от 28 августа 2015 г. № 14.N08.11.1037), показали, что тритикаин- α устойчив в условиях среды желудка, где его способность расщеплять токсические компоненты клейковины максимальна. Рекомбинантный белок тритикаин- α значительно снижает уровень воздействия гидролизатов глютена на проницаемость клеточной культуры энтероцитов человека Caco-2. Полученные результаты продемонстрировали возможность успешного применения тритикаина- α в ферментативной терапии целиакии, направленной на детоксикацию клейковины на стадии желудочного пищеварения. Анализ чувствительности к температуре и pH для протеолитической активности тритикаина- α , а также его стабильности в условиях, имитирующих желудочно-кишечную среду, показывают, что этот фермент можно рассматривать как перспективный активный компонент для детоксикации глютена при пероральном введении [3, 4].

Целью данной работы является изучение физико-химических и технологических свойств рекомбинантного белка тритикаин- α с целью создания нового лекарственного препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся активный фармацевтический ингредиент (АФИ) тритикаин- α – лиофилизированный порошок (тритикаин- α : маннитол : ПВП в процентном соотношении 50 : 25 : 25).

Тритикаин- α – рекомбинантный белок цистеиновых протеиназ папаинового типа. Представляет собой смесь белков. В состав смеси входит полипептид с молекулярной массой ~ 42 кДа, содержащий в первичной структуре аминокислотную последовательность продомена тритикаина- α , слитную с протеиназным доменом тритикаина- α . Смесь белков имеет в своем составе также продукты автокаталитического протеолиза: полипептид с молекулярной массой ~ 30 кДа, содержащий в первичной структуре аминокислотную последовательность протеиназного домена тритикаина- α , и пептиды с молекулярной массой ~11–12 кДа, представляющие отщепленные последовательности продомена тритикаина- α [5].

Фармацевтическую субстанцию тритикаина- α получали в соответствии с патентом RU 2603054 [6]. Рекомбинантный белок тритикаин- α помещали в сосуд с крышкой-переходником для крепления к сублимационной сушилке. Замораживали до температуры -70°C в морозильнике Sanyo Ultra Low MDF-U3086S (-70°C) и выдерживали в течение 2 часов. Процесс лиофилизации проводили в течение 24 часов при температуре испарителя -50°C и вакууме 0,03–0,04 миллибар. По завершении лиофильной сушки флаконы вскрывали.

Оценку качества АФИ проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV по физико-химическим и технологическим показателям: растворимость в воде и спирте различной концентрации (ОФС 1.2.1.0005.15); степень сыпучести (ОФС 1.4.2.0016.15, прибор Erweka GTL, Германия); насыпной объем (ОФС 1.4.2.0016.15, тестер ERWEKA SVM 1, Германия); потеря в массе при высушивании (ОФС.1.2.1.0010.15, сушильный шкаф Binder FED 53, Германия) [7].

На основании полученных данных производили расчет индекса прессуемости, или индекса Карра (USP), и индекса Хауснера [8].

Взаимосвязь индексов Хауснера и Карра с характеристикой сыпучести порошков показана в таблице 1.

Пористость. Исходя из значений истинной и насыпной плотности можно провести расчет пористости. Пористость определяли по формуле:

$$\Pi = (1 - P / \rho) \cdot 100 \%,$$

где Π – пористость, %, P – насыпная плотность, г/см³, ρ – плотность, г/см³ [8].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На этапе фармацевтической разработки новой лекарственной формы – твердых капсул, содержащих тритикаин- α , с целью выбора оптимального состава вспомогательных веществ и технологических параметров процесса производства проводили изучение технологических и физико-химических свойств АФИ.

Тритикаина- α -лиофилизат, состоящий из тритикаина- α , маннитола и ПВП в процентном соотношении 50 : 25 : 25, представляет собой однородную волокнистую массу от белого до серовато-белого цвета.

Результаты изучения технологических

свойств фармацевтической субстанции тритикаина- α представлены в таблице 2.

Проведенные исследования показали, что субстанция (тритикаин- α : маннитол : ПВП в процентном соотношении 50 : 25 : 25) обладает хорошей сыпучестью. Об этом свидетельствуют полученные в эксперименте: значения угла естественного откоса, насыпная плотность до и после уплотнения. Хорошую сыпучесть подтверждают также значения рассчитанных индексов Карра и Хауснера (17,9 и 1,31 соответственно). Возможно, хорошая сыпучесть связана с введением в состав субстанции криопротектора и вспомогательного вещества ПВП [9]. Однако, учитывая состояние белка, представляющего собой волокнистую массу, вопросы сыпучести и однородности дозирования при разработке оптимальных технологических параметров могут быть весьма актуальны. Для решения данной задачи необходимо подобрать вспомогательные вещества, обладающие очень хорошей или превосходной сыпучестью, способные образовывать с лиофилизатом однородную сыпучую смесь, не расслаивающуюся в процессе смешивания и дозирования.

Следующим этапом исследования было изучение растворимости тритикаина- α в воде очищенной и спирте этиловом различной концентрации. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 1. – Взаимосвязь индексов Карра и Хауснера с характеристикой сыпучести порошков

Индекс Карра	Характеристика сыпучести	Индекс Хауснера
< 10	Превосходная	1,00–1,11
11–15	Очень хорошая	1,12–1,25
16–20	Хорошая	1,26–1,34
21–25	Удовлетворительная	1,35–1,45
26–31	Плохая	1,46–1,59
32–37	Очень плохая	> 1,60

Таблица 2. – Технологические показатели фармацевтической субстанции тритикаина- α (средний показатель \pm SN, n=5)

Показатель	Значение
Сыпучесть, г/с	10,9 \pm 0,2
Угол естественного откоса, °	36,6 \pm 0,3
Насыпная плотность до уплотнения, г/см ³	0,44 \pm 0,10
Насыпная плотность после уплотнения, г/см ³	0,53 \pm 0,12
Пористость, %	74,59 \pm 0,75
Индекс Хауснера	1,31 \pm 0,078
Индекс Карра	17,9 \pm 0,092
Потеря в массе при высушивании, %	Не более 1

Таблица 3. – Растворимость фармацевтической субстанции тритикаина- α

Растворитель	Результаты
Вода очищенная	Растворим
Спирт этиловый 20 %	Мало растворим
Спирт этиловый 40 %	Очень мало растворим
Спирт этиловый 70 %	Практически нерастворим
Спирт этиловый 90 %	Практически нерастворим

Как видно из таблицы 3, фармацевтическая субстанция тритикаина- α растворима в воде. Растворимость в этиловом спирте уменьшается пропорционально увеличению концентрации спирта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование физико-химических свойств АФИ рекомбинантного белка тритикаина- α , порошка лиофилизированного, в сочетании с маннитолом и ПВП, показало, что он растворим в воде, хуже растворим в спирте этиловом (практически не растворим в 90 % спирте) и характеризуется потерей в массе при высушивании не более 1 %. Изучение наиболее важных технологических характеристик – сыпучести, угла естественного откоса, насыпной плотности, рассчитанных значений индексов Карра и Хауснера – свидетельствовало о хорошей степени сыпучести АФИ. Однако для обеспечения точности дозирования лекарственного препарата, с учетом волокнистой структуры белка, потребуется введение вспомогательных веществ с целью улучшения степени сыпучести до очень хорошей либо превосходной.

SUMMARY

I. I. Krasnyuk, V. V. Tarasov,
Zh. M. Kozlova, O. I. Stepanova,
I. I. Krasnyuk (jn), V. V. Kuhach
STUDYING OF PHYSICAL - CHEMICAL
AND TECHNOLOGICAL PROPERTIES
OF TRITICAIN- α

This work is devoted to study of the physical-chemical and technological properties of triticain- α with the aim of further development of the drug in the form of hard capsules for the treatment of celiac disease. The object of the study was lyophilized powder of recombinant protein triticain- α in combination with mannitol and polyvinylpyrrolidone (PVP). The study was conducted in accordance with the requirements

of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV ed. (GF XIV). Triticain- α is soluble in purified water, solubility in alcohol decreases with increasing alcohol concentration. Determination of flowability, angle of natural slope, bulk density, porosity, calculation of Carr and Hausner indices demonstrated a good degree of flowability of the pharmaceutical substance studied. Due to the fibrous nature of the protein structure in the development of the dosage form the introduction of excipients to increase the degree of flowability up to a very good or excellent one will be required.

Keywords: triticain- α , recombinant protein, celiac disease, physical-chemical and technological properties, the development of capsules, quality assessment.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бельмер, С. В. Целиакия: исходы и новые подходы к диагностике / С. В. Бельмер, Т. В. Гасилина // Лечащий Врач. Москва. – 2012. – № 8 – С. 56–61.
2. Celiac disease: summary, Evidence Report/Technology Assessment: Number 104 / A. Rostom [et al.] // Agency for Healthcare Research and Quality. – Publication Number 04-E029-1, June 2004 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ahrq.gov/clinic/epcs/sums/ceciacsum.htm>. – Дата доступа: 14.01.2019.
3. Горгун, Ю. В. Клинико-морфологическая диагностика целиакии / Ю. В. Горгун, А. С. Портянко // Медицинские новости. – 2007. – № 10. – С. 31–35.
4. Rowe, R. C. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth edition / C. R. Rowe, P.J. Sheskey, M. E. Quinn. – Published by the Pharmaceutical Press An imprint of RPS Publishing- Typeset by Data Standards Ltd, Frome, Somerset Printed in Italy by L.E.G.O., London SE1 7JN, UK. – 937 p.
5. Способ получения лекарственного средства для лечения целиакии и лекарственное средство, полученное эти

способом: пат. RU 2674763 / А. А. Замятин [и др.] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://patents.google.com/patent/RU2674763C1/ru>. – Дата доступа: 14.01.2019.

6. Способ получения белков семейства цистеиновых протеаз пшеницы (*triticum aestivum*) и препарат белка тритикаинальфа, полученный этим способом: пат. RU 2603054 / А. А. Замятин [и др.] [Электронный ресурс]. – Режим доступа <https://patents.google.com/patent/RU2603054C2/ru>. – Дата доступа: 14.01.2019.

7. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд., Т. II. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. – Дата доступа: 14.01.2019.

8. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фар-

мацевтической отрасли / под ред. С. Н. Быковского [и др.]. – М. Изд-во Перо, 2015. – 472 с.

9. Аршинова, О. Ю. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов / О. Ю. Аршинова, Н. А. Оборотова, Е. В. Санарова // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. – № 1 (2). – С. 45–54.

Адрес для корреспонденции:

121019, Российская Федерация,
г. Москва, Никитский б-р, 13,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
Институт фармации,
кафедра фармацевтической технологии,
тел.: 89260122191,
e-mail: aganusya1@yandex.ru,
Козлова Ж. М.

Поступила 15.02.2019 г.